

Avaliação das variações no tempo de relaxação da água em bananas durante o amadurecimento

Introdução

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de baixa resolução é uma técnica amplamente utilizada para investigar as propriedades físico-químicas da água em tecidos vegetais (RAFFO et al., 2005). As análises são baseadas em medidas de tempos de relaxação transversal (T_2) e longitudinal (T_1) e no coeficiente de autodifusão (D). Recentemente, Raffo et al. (2005) analisaram o tempo de relaxação transversal (T_2) e o coeficiente de autodifusão (D) da água em fragmentos de bananas (~ 600 mg) durante um período de armazenamento de sete dias. Os autores relataram três tempos de relaxação T_2 . O T_2 mais curto (T_{2pc}) foi associado como a água ligada às paredes celulares ou aos grânulos de amido. O valor de T_2 intermediário foi relacionado à água citoplasmática e o de T_2 mais longo a água vacuolar. Durante o período de sete dias de armazenamento os valores de T_2 atribuídos à água do citoplasma (T_{2cit}) e ao vacúolo (T_{2vac}) aumentaram gradualmente de 90 para 190 ms e de 320 para 610 ms, respectivamente. Os autores interpretaram esta tendência como sendo correlacionada com o desaparecimento dos grânulos de amido (de aproximadamente 18 % para 3%), que atuaria como um sítio de relaxação. Como estes grânulos estão presentes somente no citoplasma, os autores explicam o aumento de T_{2vac} propondo que a água nestes dois compartimentos estaria conectada pela difusão através de uma membrana. O desaparecimento do amido no citoplasma também contribuiria para o aumento do T_2 na água presente no vacúolo.

Neste trabalho analisamos o tempo de relaxação T_2 utilizando bananas intactas com o objetivo de eliminar o efeito de injúria nos resultados. Embora os resultados obtidos tenham sido similares aos obtidos por Raffo et al. (2005), propomos uma nova hipótese para o aumento dos valores de T_2 baseados na redução dos íons Fe^{+3} para Fe^{+2} .

Materiais e Métodos

As amostras de bananas foram coletadas ainda verdes e mantidas em uma sala refrigerada a $22 \pm 1^\circ C$. O grau de maturação foi determinado utilizando a escala de cores descrita por Loesecke (1950): estágio 1 = totalmente verde, estágio 2 = verde com traços amarelos,

estágio 3 = mais verde do que amarelo, estágio 4 = mais amarelo do que verde, estágio 5 = amarelo com ponta verde, estágio 6 = totalmente amarelo e estágio 7 = amarelo com pontos marrons. Foram utilizadas seis bananas em cada experimento.

Nos experimentos utilizando bananas injuriadas, foi utilizado amassamento por compressão mecânica ou por congelamento por armazenamento a $-20^\circ C$ por cinco horas.



Foto: Fayene Zeferino Ribeiro

Cinco soluções aquosas de ácido D(+)-Galacturônico/ Fe^{+3} , com razões molares variando de 0,5 a 200 vezes foram preparados pela

dissolução do ácido em uma solução estoque de $3.6 \times 10^{-4} \text{ Mol/L } FeCl_3 \cdot 6H_2O$. O ácido D(+)-Galacturônico (Sigma-Aldrich) e o sal $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Mallinkrodt Chemicals) foram adquiridos em grau analítico. Água com alta pureza (Milli-Q Millipore) foi utilizada para a o preparar a solução estoque.

Os tempos de relaxação transversal (T_2) foram determinados utilizando a seqüência de pulso CPMG (BRAUN, 1998) em um aparelho de RMN com um campo magnético de 2.1 Teslas.

Autores

Fayene Zeferino Ribeiro,
Química, MSc., Graduanda,
Universidade de São Paulo,
Instituto de Química de São Carlos,
Avenida Trabalhador São-Carlense 400,
São Carlos, SP, Brazil, 13560-590,
faylittelfay@yahoo.com.br

Lucinéia Vizzotto Marconcini,
Química, Pós-doutoranda, Dra.,
Embrapa Instrumentação
Agropecuária, C.P. 741,
CEP 13560-970, São Carlos, SP,
lu_vizzotto@yahoo.com.br

Lucio Leonel Barbosa,
Química, Pós-doutorando, Dr.,
Embrapa Instrumentação
Agropecuária, C.P. 741,
CEP 13560-970, São Carlos, SP,
luciolbarbosa@yahoo.com.br

Luiz Alberto Colnago,
Farmácia Bioquímica, Dr.,
Pesquisador,
Embrapa Instrumentação
Agropecuária, C.P. 741,
CEP 13560-970, São Carlos, SP,
colnago@cnpdia.embrapa.br

Resultados e Discussão

A Figura 1 mostra o efeito das injúrias causadas por amassamento (Fig. 1 a, b e c) e por congelamento (Fig. 2 d) na distribuição dos tempos de relaxação transversal (T_2). Os espectros foram obtidos pela transformada inversa de Laplace (ILT) dos dados de CPMG.

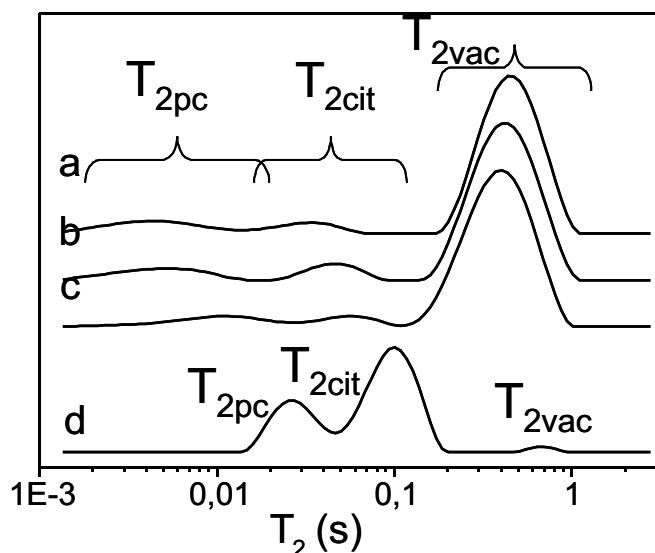


Fig. 1. Distribuição dos valores T_2 obtidos de bananas 'ouro' no estágio três de maturação, calculado pela ILT dos dados de CPMG. a) bananas intactas, b) e c) após 30 e 2 horas após injúria mecânica e d) banana após cinco horas de armazenamento a -20°C e 3 horas a 22°C .

Na Figura 1 pode ser observado que os valores de T_{2pc} e T_{2cit} aumentam com a injúria de 4 a 10 ms e de 30 a 70 ms, respectivamente, e que o T_{2vac} diminuiu de 450 para 400 ms (espectros de a a c), indicando o efeito da injúria mecânica no valor de T_2 . Este efeito é mais pronunciado nas bananas que foram injuriadas pelo congelamento (espectro d), os valores de T_{2pc} e T_{2cit} aumentaram de 4 a 25 e de 30 a 100 ms, respectivamente, e suas áreas aumentaram mais que 95% em relação à área total no espectro. Entretanto, o valor do terceiro pico de T_2 aumentou para 700 ms e sua área relativa foi reduzida a 5%.

O congelamento da água destrói as paredes celulares, permitindo que a água, inicialmente compartimentalizada no vacúolo, citoplasma e espaços intercelulares, se misturem após a amostra retornar a 22°C para as medidas de RMN (HILLS et al., 1997). Este fenômeno explica a redução da área do sinal da água vacuolar e o aumento dos outros sinais. Desta forma, a Figura 1 demonstra que a injúria pode alterar tanto os valores de T_2 como suas áreas relativas. Ela também indica a necessidade do estudo do processo de amadurecimento de bananas intactas, como proposto neste trabalho.

A Figura 2a apresenta a média e o desvio padrão dos valores de T_2 (T_{2pc} , T_{2cit} e T_{2vac}) obtidos para seis bananas 'ouro' intactas durante sete dias de amadurecimento. Os valores de T_{2pc} e T_{2cit} não variaram significativamente durante o amadurecimento, sendo os valores observados menores que os determinados previamente (RAFFO et al.,

2005). Entretanto, o aumento do valor do T_{2vac} de aproximadamente 400 ms (estágio 3) para 650 ms (estágio 7) é similar ao observado por Raffo et al. (2005) utilizando fragmentos de banana.

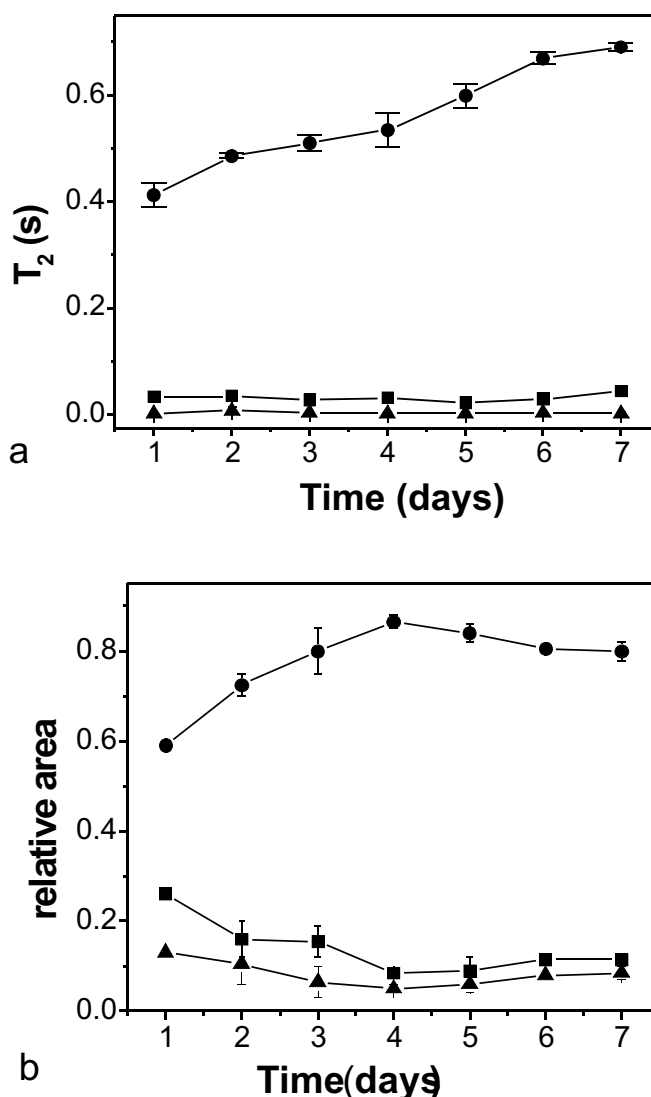


Fig. 2. Variação dos valores de T_2 (s) (a) e das áreas relativas (b) da água contida no vacúolo (), no citoplasma (■) e nas paredes celulares (▲) em bananas intactas em função do tempo de armazenamento (dias).

Como nossas medidas foram realizadas com bananas intactas, foi possível eliminar o efeito das injúrias nos tecidos. Raffo et al. (2005) atribuíram o aumento do valor de T_{2vac} durante o amadurecimento devido o desaparecimento do amido no citoplasma. Entretanto, os grânulos de amido não estão livres no citoplasma, mas localizados em uma organela, o amiloplasto. Portanto, a água tem de se difundir entre três compartimentos: do vacúolo para o citoplasma, deste para o amiloplasto e finalmente retornar para o vacúolo, para que possa ser influenciada pelo amido. Assim, sugerimos que este mecanismo não é tão efetivo quanto proposto e apresentamos um novo mecanismo para a variação dos valores de T_2 .

Um dos mecanismos de relaxação que pode alterar o T_2 é a variação na concentração de espécies paramagnéticas

solução. Sabe-se que o tempo de relaxação do solvente é reduzido significativamente na presença de íons paramagnéticos, tais como Fe^{+3} , Cu^{+2} e Mn^{+2} , ainda que estejam presentes em concentrações muito baixas. Sabe-se também que bananas contêm íons de ferro, manganês e cobre (HARDISSON et al., 1998). Tais íons paramagnéticos podem reduzir o tempo de relaxação da água. A concentração de ferro na parte comestível na banana é maior que 2 mg/100 g (HARDISSON et al., 1998), o que pode diminuir o valor de T_2 da água livre em aproximadamente 0,2 s quando está em seu estado de oxidação de Fe^{+3} (Fig. 3). Estes valores estão dentro do intervalo de T_2 observados em bananas verdes.

Durante o amadurecimento, as pectinas são solubilizadas, alterando a textura do fruto e produzindo o ácido galacturônico (HGal), que pode reduzir íons Fe^{+3} a íons Fe^{+2} (DEIANA et al., 1989). Uma vez que a água na presença de Fe^{+2} possui um tempo de relaxação T_2 maior que na presença de Fe^{+3} , a redução de íons férricos para ferrosos pode ser o efeito dominante no aumento do tempo de relaxação da água conforme as bananas amadurecem.

Os efeitos no tempo T_2 da água causados pela redução dos íons férrico para ferroso pelo ácido galacturônico são mostrados na Figura 3. Esta Figura mostra que o aumento da razão HGal/ Fe^{+3} aumenta o valor de T_2 da água de cerca de 0,2 s para 0,7s. Embora seja possível detectar este efeito em aproximadamente cinco minutos após a mistura ser realizada, ele torna-se mais pronunciado após 48 horas. Nós sugerimos que uma redução similar dos íons Fe^{+3} para Fe^{+2} pelo ácido galacturônico produzido pela hidrólise da pectina é o principal mecanismo para o aumento de T_2 durante o amadurecimento de bananas.

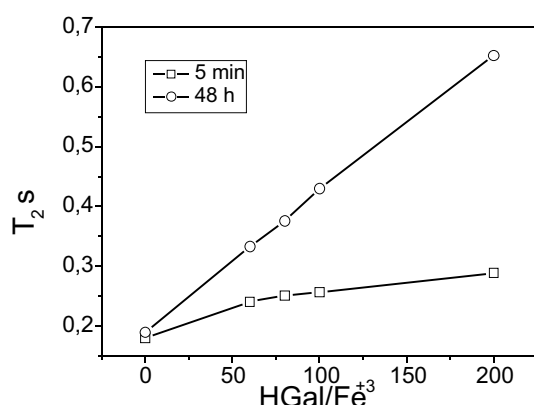


Fig. 3. Variação no tempo T_2 da água como uma função na relação entre ácido galacturônico e íons Fe^{+3} ($\text{Fe}^{+3} = 3.6 \times 10^{-4}$ mol) em (□) 5 min e (○) 48 horas após a preparação.

Conclusões

A partir dos resultados apresentados, concluímos que é necessário utilizar bananas intactas para a medida da variação de T_2 durante o amadurecimento, uma vez que as injúrias alteram seu valor. Também propomos uma nova interpretação para o aumento do valor de T_2 da água na parte comestível da banana durante o amadurecimento. Ela é baseada na redução do Fe^{+3} to Fe^{+2} por ácido galacturônico e é mais plausível do que proposta por Raffo et al. (2005).

Agradecimentos

Agradecemos as agências de fomento FAPESP, CNPq, CAPES e FINEP pelo suporte financeiro.

Referências

- BRAUN, S.; KALINOWSKI, H. O.; BERGER, S. **150 and more basic NMR experiments, a practical course**. 2nd expanded edition. Weinheim: Wiley-VCH, 1998.
- DEIANA, S.; GESSA, C.; SOLINAS, V.; PIU, P. SEEGER, R. Complexing and redox properties of the system D-galacturonic acid-iron(III). **J. Inorg. Biochem.**, New York, v. 35, n. 2, p. 107-113, 1989.
- HARDISSON, A.; RUBIO, C.; BAEZ, A.; MARTIN, M.; ALVAREZ, R.; DIAZ, E. Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) from the island of Tenerife. **Food Chem.**, London, v. 73, n. 1, p. 153-161, 2001.
- HILLS, B. P.; REMIGEREAU, B. NMR studies of changes in subcellular water compartmentation in parenchyma apple tissue during drying and freezing. **Int J Food Sci Technol**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 51-61, 1997.
- LOESECK, H. W. **Chemical changes during ripening. Bananas chemistry, physiology and technology**. New York, EUA: Interscience, 1950. v. 4.
- RAFFO, A.; GIANFERRI, R.; BARBIERI, R.; BROSIO, E. Ripening of banana fruit monitored by water relaxation and diffusion ^1H -NMR measurements. **Food Chem.**, London, v. 89, n. 1, p. 149-158, 2005.

Circular Técnica, 47

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Instrumentação Agropecuária
 Rua XV de Novembro, 1542 - Caixa Postal 741
 CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: 16 2107 2800 - **Fax:** 16 2107 2902
e-mail: sac@cnpdia.embrapa.br
<http://www.cnpdia.embrapa.br>
1a. edição
 1a. impressão 2009: tiragem 300

Ministério da
 Agricultura, Pecuária
 e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Membros: Dra. Débora Marcondes B. P. Milori,
 Dr. João de Mendonça Naime,
 Dr. Washington Luiz de Barros Melo
 Valéria de Fátima Cardoso

Membro Suplente: Dr. Paulo S. P. Herrmann Junior

Expediente

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento das ilustrações: Valentim Monzane
Editoração eletrônica: Manoela Campos